

# 高压液相色谱-线性离子阱串联质谱法测定 红葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵

李鹏<sup>1</sup>, 刘凯丽<sup>2</sup>, 杨欣<sup>1\*</sup>, 赵云峰<sup>1,3</sup>, 吴永宁<sup>1,3</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021; 2. 北京市丰台区动物卫生监督所, 北京 100021;  
3. 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:** 目的 建立红葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵残留的高压液相色谱-串联线性离子阱质谱(HPLC-LIT-MS/MS)检测方法。方法 样品经过乙腈提取, 在梯度洗脱程序下经 CAPCELL PAK CR 1:20 色谱柱分离后, 采用 HPLC-LIT-MS/MS, 在二级质谱选择反应监测(SRM)模式进行测定。结果 红葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵添加水平为 10、20、50  $\mu\text{g/L}$  时, 平均回收率分别为 82.5%~103.1%和 93.7%~115.2%。检出限(LODs)分别为 0.063  $\mu\text{g/L}$  和 0.019  $\mu\text{g/L}$ , 定量限(LOQs)分别为 0.125  $\mu\text{g/L}$  和 0.075  $\mu\text{g/L}$ 。结论 该方法快速简便, 灵敏度高, 准确度和精密度均满足痕量分析要求。

**关键词:** 高压液相色谱-线性离子阱质谱法(HPLC-LIT-MS); 红葡萄酒; 多菌灵; 甲基硫菌灵

## Determination of carbendazim and thiophanate-methyl in red wine by high pressure liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry

LI Peng<sup>1</sup>, LIU Kai-Li<sup>2</sup>, YANG Xin<sup>1\*</sup>, ZHAO Yun-Feng<sup>1,3</sup>, WU Yong-Ning<sup>1,3</sup>

(1. China National Center For Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. Beijing Fengtai District Animal Health Inspection, Beijing 100021, China; 3. Key Lab of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a method of high pressure liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry (HPLC-LIT-MS) for the determination of carbendazim and thiophanate-methyl in red wine.

**Methods** Samples were ultrasonically extracted with acetonitrile, separated on a CAPCELL PAK CR 1:20 column with gradient elution and the mass spectrometric acquisition was carried out under the mode of selected reaction monitoring (SRM). **Results** The average recoveries of carbendazim and thiophanate-methyl in red wine at 10, 20  $\mu\text{g/L}$  and 50  $\mu\text{g/L}$  were 82.5%~103.1% and 93.7%~115.2%, respectively. The limits of detection (LODs) were 0.063  $\mu\text{g/L}$  and 0.019  $\mu\text{g/L}$ , and the limits of quantification (LOQs) were 0.125  $\mu\text{g/L}$  and 0.075  $\mu\text{g/L}$ . **Conclusion** The established method is fast, simple, selective, precise and accurate, and it is suitable for quantitative and qualitative detection of carbendazim and thiophanate-methyl in red wine.

**KEY WORDS:** high pressure liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry (HPLC-LIT-MS); red

基金项目: 十二五国家科技支撑计划(2011BAK10B06)

**Fund:** Supported by National Support Program for Science and Technology (2011BAK10B06)

\*通讯作者: 杨欣, 副研究员, 主要研究方向为食品安全研究。E-mail: beijing-yangxin@163.com

李鹏和刘凯丽对本文贡献相同。

\*Corresponding author: YANG Xin, Research Associate, China National Center For Food Safety Risk Assessment, No.7 Panjiayuananli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. E-mail: beijing-yangxin@163.com

LI Peng and LIU Kai-Li contributed equally to this work.

wine; carbendazim; thiophanate-methyl

## 1 引言

随着人们生活水平的提高,葡萄酒作为一种富含营养物质的健康饮品<sup>[1]</sup>,越来越受到消费者的青睐,葡萄酒的生产、消费和进出口贸易都在逐年增加。

多菌灵(carbendazim)和甲基硫菌灵(thiophanate-methyl)(图1)属广谱、内吸性杀菌剂,广泛应用于蔬菜和水果的种植及保鲜过程<sup>[2]</sup>。为防止白腐病和霜霉病,目前我国在葡萄栽培的过程中允许使用多菌灵和甲基硫菌灵。葡萄酒是经新鲜葡萄酿制而成,在酿造工艺中不对葡萄原料进行清洗,致使葡萄酒中容易存在农药残留。尽管葡萄酒酿造工艺会降低农药残留的浓度<sup>[3-5]</sup>,但研究表明葡萄酒中仍存在农药残留问题<sup>[6]</sup>。目前人们对谷物、果蔬等农作物的农药残留有一定的认识,但对葡萄酒和果酒这类深加工产品中的农药残留问题还没有给予足够的重视。欧盟规定酿酒葡萄中多菌灵的最大残留限量(MRL)为0.05 mg/kg,国际食品法典委员会(CAC)、日本和中国规定葡萄中多菌灵 MRL 为 3 mg/kg,而美国已禁止使用多菌灵。但国际上尚无葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵的残留限量标准,因此,有必要建立快速、简便、准确、灵敏的方法监测葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵的残留。

目前对食品中多菌灵和甲基硫菌灵常用的检测方法主要是高压液相色谱法<sup>[7-10]</sup>和高压液相色谱-质谱联用法<sup>[11-14]</sup>。上述方法采用 QuEChERS 和固相萃取等前处理方法对样品进行净化,过程繁琐耗时且成本较高,不能满足大批量快速检测的要求。本研究简化前处理方法,样品经乙腈溶液提取后,上清液直接采用高压液相色谱-串联线性离子阱质谱(HPLC-LIT-MS/MS)对多菌灵和甲基硫菌灵进行测定,不仅大大提高分析效率和降低分析成本,而且灵敏度高、定量准确,在一定程度上实现了快速检测。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

LTQ 液相色谱-质谱联用仪(美国 Finnigan 公司),配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 2.5 数据处理系统; Sigma3K-15 离心机(美国 Sigma 公司),配有 12156 型转子; Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

甲酸铵(色谱纯,瑞士 Fluka 公司); 甲酸(色谱纯,美国 DiKMA 公司); 乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司); 氯化钠(分析纯,天津津科精细化工研究所)。

多菌灵和甲基硫菌灵标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

红葡萄酒样品购自北京某大型超市。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准储备液的配制

分别准确称取 10.0 mg 多菌灵和甲基硫菌灵标准品于 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,配制成 100 mg/L 标准储备液。分别吸取 100  $\mu$ L 上述储备液于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,摇匀后配制成 1.0 mg/L 混合标准中间液, -18  $^{\circ}$ C 以下储存,备用。

#### 2.2.2 样品前处理

准确量取 10 mL 红葡萄酒样品于 50 mL 塑料离心管内,加入 2 g 氯化钠和 10 mL 乙腈,涡旋混匀 30 s,超声萃取 20 min,于 4  $^{\circ}$ C 下 8000 r/min 离心 10 min,转移上清液(乙腈层)于另一 50 mL 刻度管内。残渣用乙腈重复提取一次,合并两次上清液并用乙腈定容至 25 mL。取 1.0 mL 上清液过 0.22  $\mu$ m 有机滤膜后,供液相色谱质谱仪分析。

空白基质溶液的制备:量取 10 mL 空白基质样品,按 2.2.2 节处理得空白基质溶液,用于配制基质匹配工作曲线。

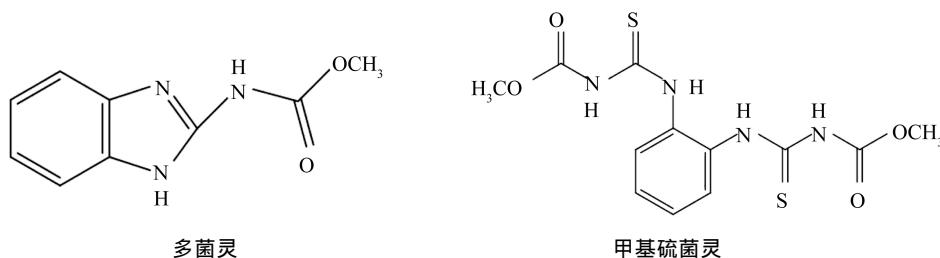


图1 多菌灵和甲基硫菌灵结构式

Fig. 1 Structural formula of carbendazim and thiophanate-methyl

### 2.2.3 实验条件

色谱条件: 色谱柱: 资生堂 CAPCELL PAK CR 1:20 色谱柱(100 mm×2.0 mm, 3 μm); 流动相: 乙腈(A), 含 0.1%甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵的水溶液(B); 流速: 200 μL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。梯度洗脱程序见表 1。

质谱条件: 扫描方式为正离子二级质谱选择反应监测(SRM); 电离方式: 电喷雾电离, ESI (+); 喷雾电压为 4 kV; 毛细管电压 35 V; 棱镜电压 75 V; 鞘气流速 35 arb; 辅助气流速 15 arb; 毛细管温度 300 °C。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件  
Table 1 HPLC gradient elution condition

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	35	65
1.5	35	65
4	90	10
6	90	10
8	35	65

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱-质谱条件优化

本实验采用流动注射质量浓度为 500 μg/L 的单标工作液对多菌灵和甲基硫菌灵的具体质谱参数分别进行优化, 结果见表 2。根据实验结果选定多菌灵的分子离子 192 为母离子, 160 和 119 为定量离子和定性确证离子; 选定甲基硫菌灵的分子离子 343 为母离子, 311 和 268 为定量离子和定性确证离子, 满足欧盟 2002/657/EC 指令<sup>[15]</sup>对低分辨质谱进行确证分析的要求。

在流动相中加入 0.1%(体积分数)甲酸可以增加

多菌灵在正离子检测模式下的电离效率, 促进  $[M+H]^+$  离子生成。同时根据 CR 柱保留机理, 向 10 mmol/L 甲酸铵的水溶液中加入甲酸可以抑制多菌灵分子中酰胺基的解离, 在酸性条件下更有利于多菌灵的离子化。因此正离子检测模式下测定多菌灵以含 0.1%甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵的水溶液和乙腈作为流动相, 优化梯度洗脱条件。

### 3.2 基质效应

为了考察共提物对基质效应的影响, 本研究比较了同一空白加标样品(20 μg/L)用乙腈配制的标准曲线计算的回收率和基质匹配标准曲线的回收率, 结果见表 3。由表 3 可见, 基质效应对分析结果存在一定影响, 两个化合物均有基质抑制效应。因此有必要采用基质匹配的标准曲线来降低基质效应。

### 3.3 线性范围和检出限

为降低基质效应对待测化合物定性和定量准确度的影响, 采用空白红葡萄酒提取后的溶液配制浓度分别为 2、4、8、20、50 μg/L 的系列标准溶液。将系列标准溶液分别进样, 以目标化合物的浓度  $X$  为横坐标, 相应的峰面积  $Y$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 4。

向空白红葡萄酒中添加不同浓度的多菌灵和甲基硫菌灵混合标准溶液, 按照 2.2.2 节中的前处理方法处理上述加标样品, 以其仪器响应值为基准进行计算, 3 倍信噪比对应的浓度为检出限(LOD), 10 倍信噪比对应的浓度为定量限(LOQ)。多菌灵和甲基硫菌灵在红葡萄酒中的 LOD 分别为 0.063 μg/L 和 0.019 μg/L, LOQ 为 0.125 μg/L 和 0.075 μg/L。具体结果见表 4。

表 2 HPLC-LIT-MS 法主要质谱参数

Table 2 Main parameters of the mass-spectrometry obtained by the method of HPLC-LIT-MS

化合物	保留时间(min)	母离子( $m/z$ )	碰撞能量(%)	二级子离子( $m/z$ )
多菌灵	2.87	192	28	160; 119
甲基硫菌灵	4.21	343	18	311; 268

表 3 乙腈配制标准曲线和基质匹配标准曲线计算多菌灵和甲基硫菌灵的加标回收率( $n=6$ )

Table 3 Recoveries calculated according to acetonitrile solvent calibration and matrix-matched calibration for carbendazim and thiophanate-methyl( $n=6$ )

化合物	乙腈配制标准曲线		基质匹配标准曲线	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
多菌灵	52.3	4.7	98.1	2.8
甲基硫菌灵	68.9	6.2	93.7	7.7

### 3.4 方法的准确度和精密度

基于各国和地区规定葡萄和酿酒用葡萄中多菌灵的 MRL 标准, 本实验参考 MRL 的最低值(0.05 mg/kg)进行加标回收实验。在空白红葡萄酒中分别添加 10、20、50  $\mu\text{g/L}$  的多菌灵和甲基硫菌灵混合标准溶液, 按上述试验方法进行处理与测定。每个浓度水

平取 6 份样品进行试验, 计算平均加标回收率及相对标准偏差(RSD)。多菌灵和甲基硫菌灵在红葡萄酒基质中的平均加标回收率分别为 82.5%~103.1%和 93.7%~115.2%, 相对标准偏差分别为 2.8%~5.6%和 3.1%~8.4%, 具体结果见表 5。空白红葡萄酒样品和 20  $\mu\text{g/L}$  加标样品的 SRM 色谱图见图 2。可见, 该方

表 4 红葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵的检出限(LOD)、定量限(LOQ)、线性方程和相关系数( $r$ )

Table 4 LOD, LOQ, regression equation and regression coefficient of carbendazim and thiophanate-methyl in red wine

化合物	线性方程	相关系数( $r$ )	LOD( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ( $\mu\text{g/L}$ )
多菌灵	$Y = -86.19 + 64162X$	0.9976	0.063	0.125
甲基硫菌灵	$Y = -146.1 + 11601X$	0.9972	0.019	0.075

表 5 红葡萄酒基质加标回收实验结果( $n=6$ )

Table 5 Results of blank wine fortified experiments ( $n=6$ )

化合物	添加水平( $\mu\text{g/L}$ )					
	10		20		50	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
多菌灵	82.5	3.2	98.1	2.8	103.1	5.6
甲基硫菌灵	107.4	8.4	93.7	7.7	115.2	3.1

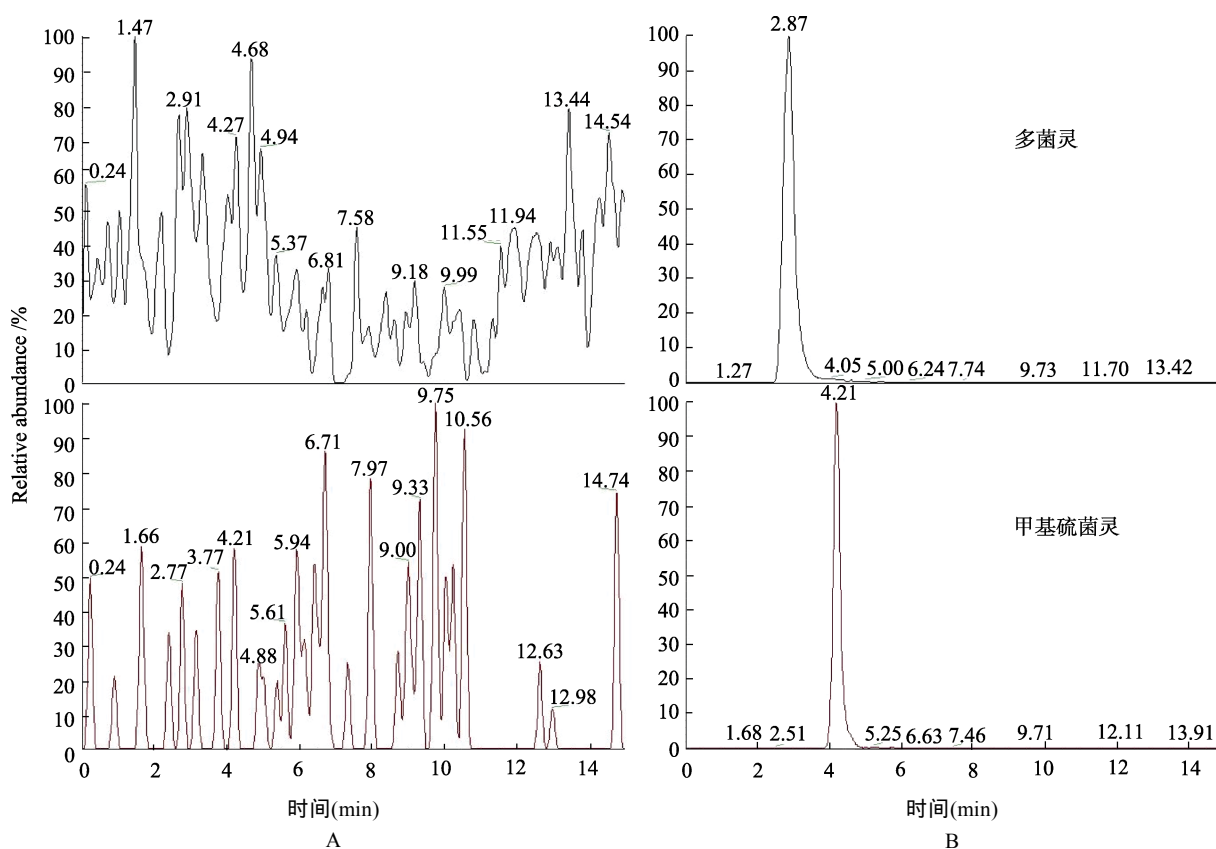


图 2 空白红葡萄酒样品(A)和 20  $\mu\text{g/L}$  多菌灵和甲基硫菌灵加标红葡萄酒样品(B)SRM 色谱图

Fig. 2 SRM Chromatograms of blank red wine sample (A) and red wine sample spiked at 20  $\mu\text{g/L}$  carbendazim and thiophanate-methyl (B)

法的准确度及精密度均符合痕量分析要求。

### 3.5 实际样品检测

应用所建立的方法检测了从北京超市购买的不同品牌的 6 份红葡萄酒, 未检出多菌灵和甲基硫菌灵。

## 4 结 论

与文献报道比较, 本研究建立的方法准确度和精密度均满足红葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵的定量分析要求且检出限更低<sup>[7-14]</sup>, 同时本方法也满足红葡萄酒中多菌灵和甲基硫菌灵检测的定性确证要求。该方法快速、简便, 可用于监测市场上红葡萄酒中的多菌灵和甲基硫菌灵的残留。

### 参考文献

- [1] 李华, 王华, 袁春龙, 等. 葡萄酒工艺学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.  
Li H, Wang H, Yuan CL, *et al.* Wine technology [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [2] 林郁. 农药应用大全[M]. 北京: 农业出版社, 1989.  
Lin Y. Nongyao yingyong daquan [M]. Beijing: Agriculture Press, 1989.
- [3] Cabras P, Conte E. Pesticide residues in grapes and wine in Italy [J]. Food Addit Contam, 2001, 18(10): 880-885.
- [4] Cabras P, Angioni A. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(4): 967-973.
- [5] Ministère de l'Agriculture, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité. Direction Générale de l'Alimentation. <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/enqueteraisin.pdf>.
- [6] [http://www.pan-europe.info/Resourcess/Briefings/Message\\_in\\_a\\_bottle\\_Results.pdf](http://www.pan-europe.info/Resourcess/Briefings/Message_in_a_bottle_Results.pdf).
- [7] 廖涛, 杨玉平, 程薇, 等. 苹果中多菌灵、噻菌灵和甲基托布津的高效液相色谱法分析[J]. 分析测试技术与仪器, 2010, (4): 257-261.  
Liao T, Yang YP, Cheng W, *et al.* Determination of carbendazim, thiabendazole and methyl thiophanate in apple by high performance liquid chromatography [J]. Anal Test Technol Instrum, 2010, (4): 257-261.
- [8] 周雪晴, 谢艳丽, 张青, 等. 高效液相色谱法测定香蕉中的多菌灵、噻菌灵、甲基硫菌灵[J]. 化学分析计量, 2012, (2): 34-36.  
Zhou XQ, Xie YL, Zhang Q, *et al.* Determination of carbendazim, thiabendazole and methylthiophanate in banana by high performance liquid chromatography[J]. Chem Anal Meterage, 2012, (2): 34-36.
- [9] Singh S, Foster G, Khan S. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using micro-

wave-assisted extraction [J]. J Chromatogr A, 2007, 1148: 152-157.

- [10] Wu QH, Li YP, Wang C, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples [J]. Anal Chim Acta, 2009, 638: 139-145.
- [11] 张志勇, 龚勇, 单伟力, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定黄瓜和土壤中甲基硫菌灵和多菌灵[J]. 色谱, 2012, 30(1): 91-94.  
Zhang ZY, Gong Y, Shan WL, *et al.* Determination of thiophanate-methyl and carbendazim in cucumber and soil by QuEChERS-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(1): 91-94.
- [12] 刘谦, 颜红. 快速溶剂萃取-高效液相色谱串联质谱测定水果和果汁中的多菌灵[J]. 农药科学与管理, 2012, (6): 28-31.  
Liu Q, Yan H. Determination of carbendazim in fruits and juice by accelerated solvent extraction technology coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Pestic Sci Admin, 2012, (6): 28-31.
- [13] Nakamura M, Furumi Y, Watanabe F, *et al.* Determination of carbendazim, thiophanate, thiophanate-methyl and benomyl residues in agricultural products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Hyg Soc Japan, 2011, 52(3): 148-155.
- [14] Anastasios E, Helen B, Spyros A, *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216: 5856-5867.
- [15] Official Journal of the European Communities. 2002/657/EC Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results [S].

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



李鹏, 博士生, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: 04060372@163.com



刘凯丽, 科员, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: qadin@126.com



杨欣, 副研究员, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: qadin@126.com